柑橘大实蝇气味结合蛋白基因 *BminOBP25* 的克隆、原核表达及组织表达分析

司品法，周 琼*，崔中翌

（湖南师范大学生命科学学院，长沙 410081）

摘要：【目的】昆虫的气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)与嗅觉识别密切相关，在触角感受器淋巴液内运输外界的脂溶性气味分子顺利到达嗅觉受体过程中起着关键的作用。本研究对柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* 的气味结合蛋白基因进行了克隆和表达分析，旨在更好地了解气味结合蛋白在柑橘大实蝇嗅觉识别中的作用及为进一步研究柑橘大实蝇嗅觉传递的分子机制奠定基础。【方法】利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆柑橘大实蝇的气味结合蛋白基因，并进行生物信息学分析；构建重组表达载体 pET28a(+)-*BminOBP25*，转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)中，SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定重组表达蛋白；采用荧光定量 PCR 检测该基因在柑橘大实蝇成虫不同组织中的表达。【结果】克隆获得柑橘大实蝇气味结合蛋白基因的 cDNA 全长序列，命名为 *BminOBP25*(GenBank 登录号：MH181875)。测序结果表明，*BminOBP25* 开放阅读框全长447 bp，编码 148 个氨基酸，预测分子量为 17.5 kD，编码序列具有 OBPs 典型的 6 个保守半胱氨酸和 6 个 α 螺旋区域特征。在 IPTG 诱导下目标蛋白以 6×His 标签融合蛋白的形式在宿主菌中得到稳定表达。荧光定量 PCR 分析表明，*BminOBP25* mRNA 在成虫触角、头(去除触角)、胸、腹、足、翅和产卵器中均有表达，其中在触角、头(去除触角)、足和产卵器中表达量较高。【结论】*BminOBP25* 在柑橘大实蝇成虫触角、头、足和产卵器中具有高转录活性，提示该基因在非嗅觉组织中可能也具有生理功能，特别是可能在昆虫的取食与产卵地选择过程中起重要作用，其功能还需深入研究。本研究实现了 *BminOBP25* 基因的原核表达，为深入研究 *BminOBP25* 基因的功能奠定基础。

关键词：柑橘大实蝇；*BminOBP25*；气味结合蛋白；基因克隆；组织表达分析；荧光定量 PCR

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2018)05-0537-09

Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an odorant binding protein gene *BminOBP25* from *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae)

SI Pin-Fa, ZHOU Qiong*, CUI Zhong-Yi (College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract:【Aim】The odorant binding proteins (OBPs) of insects are closely related to olfactory recognition and play a key role in the successful delivery of fat-soluble odorant molecules in the lymph nodes of the antennal sensory receptors to the olfactory receptors. In order to understand the roles of OBPs in olfactory recognition and to lay foundation for studying the molecular mechanisms of olfactory transmission in *Bactrocera minax*, an OBP gene was cloned and its expression profiles were analyzed.

基金项目：国家自然科学基金项目(31672094)；湖南省自然科学基金省市联合基金重点项目(14JJ5029)；湖南省生态学重点学科建设项目(0713)；湖南师范大学省级研究生科研创新项目(CX2016B212)

作者简介：司品法，男，1992 年 10 月生，山东滕州人，硕士研究生，研究方向为昆虫行为与化学生态学，E-mail：sipinfa@sina.cn

*通讯作者 Corresponding author，E-mail：zhoujoan@hunnu.edu.cn

收稿日期 Received：2017-11-03；接受日期 Accepted：2018-01-04

【Methods】The full-length cDNA sequence of OBP gene was cloned from *B. minax* using RT-PCR and RACE techniques, and subjected to bioinformatics analysis. The recombinant expression vector pET28a(+)-*BminOBP25* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. The expression profiles of OBP gene in different tissues of *B. minax* adults were detected by quantitative real-time PCR (qPCR).【Results】An OBP gene was cloned from *B. minax* and named *BminOBP25* (GenBank accession no.: MH181875). Its ORF is 447 bp in length encoding 148 amino acids with a predicted molecular weight of 17.5 kD. The encoded protein has typical six conserved cysteines and six α-helices. The recombinant expression vector pET28a(+)-*BminOBP25* was constructed and the target protein was stably expressed in host bacteria in the form of 6 × His tag fusion protein after IPTG induction. qPCR analysis showed that *BminOBP25* mRNA was expressed in antennae, head (without antennae), thorax, abdomen, leg, wing and ovipositor of adults, with higher expression levels in antenna, head (without antennae), leg and ovipositor.【Conclusion】*BminOBP25* has high transcriptional activity in antennae, heads, legs and ovipositors of *B. minax* adults, suggesting that *BminOBP25* may also have physiological functions in non-olfactory tissues, and especially may play important roles during the selection of insect feeding and spawning sites. Its functions need further study. In this study, the prokaryotic expression of *BminOBP25* was achieved, laying a foundation for further study of its functions.

Key words: *Bactrocera minax*; *BminOBP25*; odorant binding protein (OBP); gene cloning; tissue expression profiling; qPCR

柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* 隶属双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae)寡毛实蝇亚科(Dacinae)(陈世骧和谢蕴贞, 1955),该虫主要分布在印度、不丹(Drew *et al*., 2005)以及中国的湖南、湖北、四川、重庆、贵州、云南、广西等柑橘主产区(汪兴鉴和罗禄怡, 1995)。柑橘大实蝇的寄主范围是柑橘种类,被看作是商业柑橘的严重害虫(Dorjic *et al*., 2006; Dong *et al*., 2014; Wang *et al*., 2014)。柑橘大实蝇的卵、幼虫、蛹期阶段均较隐蔽而不利防治,因此,裸露自由生活、补充营养和交配产卵的成虫阶段是进行其防控的重要时期(刘路等, 2014)。利用嗅觉诱捕成虫,是柑橘大实蝇种群控制的高效而绿色环保的重要手段(Dong *et al*., 2014; Liu *et al*., 2016),

昆虫气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)是一类低分子量的水溶性蛋白,大多数存在于嗅觉系统的感受器淋巴液中(Pelosi and Maida, 1995)。气味结合蛋白的主要作用是结合亲脂性气味分子,将气味分子在淋巴液中转运到气味受体蛋白,引起气味受体蛋白的构象变化,进而形成动作电位,产生的电信号传递到更高级的神经中枢产生行为反应(Carey *et al*., 2010)。气味结合蛋白与气味分子的结合是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步,是昆虫嗅觉识别过程中的关键作用因子(Vogt and Riddiford, 1981; Briand *et al*., 2001)。

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术,首次克隆了柑橘大实蝇气味结合蛋白基因 *BminOBP25* 的全长,并采用实时荧光定量 PCR 技术分析了该基因在柑橘大实蝇雌雄成虫不同组织中的表达情况,为深入研究气味结合蛋白在柑橘大实蝇嗅觉识别过程的作用以及基于嗅觉的柑橘大实蝇诱捕剂的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

柑橘大实蝇蛹于 2016 年 4 月采自湖南省澧县柑橘园(29°36′33″N, 111°41′53″E),带回实验室,待其羽化后一部分在笼中饲养,另一部分分别收集柑橘大实蝇雌、雄(各 30 头)成虫的触角、头(去除触角)、胸、腹、足、翅和产卵器等 7 个不同组织,分别迅速装入 2 mL EP 管后封盖置于液氮罐中速冻,后转移至 -80℃ 冰箱中备用。

1.2 主要试剂

感受态细胞 BL21(DE3)购自 Tiangen 公司,大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 菌株, -80℃ 保存;RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;反转录系统及 qPCR 相关试剂购自 Thermo Scientific 公司;

SMARTer RACE 试剂盒、LA 酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。核酸分子量标准、蛋白分子质量标准及 SYBR Premix ExTaq 荧光试剂均购自 TaKaRa 公司；Anti-His Antibody、羊抗鼠 IgG-HRP、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自 Tiangen 公司。

1.3　总 RNA 提取和反转录

将 1.1 节笼中饲养的柑橘大实蝇雌、雄成虫各 3 头混合后经液氮研磨至粉末状，迅速转移至 1.5 mL EP 管中，采用 Trizol 法提取总 RNA。非变性琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后，按照 Thermo 反转录系统说明书操作，反转录获得 cDNA 第 1 链。

1.4　引物的设计及合成

根据 GenBank 中双翅目昆虫的 OBP 基因序列保守区段，设计引物 BminOBP25-MF 和 BminOBP25-MR 用于柑橘大实蝇 OBP 基因中间片段的扩增。根据中间片段的测序结果分别设计两条正向引物 BminOBP25 3′ GSP1 和 BminOBP25 3′GSP2 用于 3′ RACE 扩增；设计两条反向引物 BminOBP25 5′ GSP1 和 BminOBP25 5′ GSP2 用于 5′ RACE 扩增。根据 5′ RACE 和 3′ RACE 结果将序列拼接后得到基因全长，设计 1 对特异性引物 BminOBP25-CDS-F 和 BminOBP25-CDS-R 并在两端加上 *Eco*RⅠ和 *Hin*dⅢ的酶切位点及保护碱基。本研究中其他引物为试剂盒中提供，引物由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1　实验中用到的引物

Table 1　Primers used in the experiment

引物 Primers	引物序列(5′－3′) Primer sequences	引物用途 Primer usage
BminOBP25-MF	TGCCAAGACGGGAGTGAC	*BminOBP25* 中间片段的扩增 Intermediate fragment amplification of *BminOBP25*
BminOBP25-MR	TTCCAGCARCGATGATGCAACCAA	
BminOBP25 3′GSP1	CACGAGCACGAGCTGTTGAA	3′RACE
BminOBP25 3′GSP2	ATCCCAAGGGCGATAAT	
BminOBP25 5′GSP1	GCACTTCGCCGTCCTCA	5′RACE
BminOBP25 5′GSP2	CTTCAACAGCTCGTCCTCGT	
BminOBP25-CDS-F	CCGGAATTCATGTACTCAATAAAGTCTATC	基因全长克隆 Full-length cDNA cloning
BminOBP25-CDS-R	CCCAAGCTTTTAAATCAAGAAATAATCG	
qGADPH-F	AAAGGGTGGTGCCAAGAAGG	荧光定量 PCR 中内参基因扩增 Amplification of internal reference gene in real-time PCR
qGADPH-R	GTGGTGCAAGAAGCATTAGATAGATACG	
qOBP-F	GGCTAAGTGTCAGCGATGGCGATGT	荧光定量 PCR 中目的基因扩增 Amplification of target gene in real-time PCR
qOBP-R	TTGCGGTAAACTGTCCAGTATCTTC	

下划线部分为酶切位点，波浪线部分为保护碱基。The underlined section is the cleavage site of restriction enzyme, and the protected bases are in wavy line.

1.5　柑橘大实蝇气味结合蛋白基因克隆

以 1.3 节中从柑橘大实蝇中获得的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，克隆目的基因。PCR 反应总体积为 50 μL: 10×缓冲液 5 μL, dNTPs 混合液(2.5 mmol/L) 4 μL, LA 酶(5 mmol/L) 0.25 μL，上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, cDNA 模板 2.5 μL, ddH_2O 36.25 μL。混匀离心后放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环；72℃延伸 10 min。RACE PCR 扩增反应按照 SMARTer RACE 5′/3′试剂盒使用方法进行并做少许调整，需要重新制备 cDNA 并在反转录过程中加入 SMARTer A Oligonucleotide，PCR 采用巢式 PCR 引物使用试剂盒中提供的 UPM 以及 UPS 与 GSP1/GSP2 配套进行两轮扩增，PCR 反应程序为 94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环；72℃延伸 10 min。

扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，用 TaKaRa MiniBest 胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的目的片段进行连接到 pMD18-T 载体，转化感

受态细胞 TOP 10，最后将鉴定的阳性克隆菌株送往铂尚生物有限公司进行测序。

1.6 序列相关功能的生物信息学分析

信号肽预测使用在线软件 SignalP（http：// www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）分析，序列相似性搜索使用 BLAST（http：// blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）工具；氨基酸序列比对使用 ClustalW2（http：// www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html）工具。采用 MEGA 7.0 软件的邻位相连法（Neighbour-Joining）进行系统进化分析；蛋白质跨膜区分析采用 TMHMM（http：// www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）工具。

1.7 原核表达及 Western blot 检测

利用引物 BminOBP25-CDS-F/BminOBP25-CDS-R，以 1.3 节 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，通过酶切重组方法将扩增产物插入 pET28a（+）载体，构建重组表达载体，转化感受态细胞 BL21（DE3）后，涂板挑单克隆检测。将阳性克隆在 LB/Kan 培养基中于 37℃培养至 OD_{600} 为 0.6～1.0 时，加入 0.5 和 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达。抽提菌体蛋白后，用 15% SDS-PAGE 电泳检测。将分离后的蛋白转印 PVDF 膜 2 h，封闭液封闭 4 h，TBST 洗膜后加入 Anti His Antibody，37℃孵育 4 h，洗膜，加入羊抗鼠 IgG-HRP 二抗，37℃孵育 4 h，充分洗涤后，HRP-DA 底物显色试剂盒显色鉴定表达产物。

1.8 柑橘大实蝇气味结合蛋白基因组织表达谱分析

根据柑橘大实蝇气味结合蛋白编码基因全长序列设计引物，以 1.1 节中收集的柑橘大实蝇雌雄成虫不同组织提取的总 RNA 经反转录得到的 cDNA 为模板，以 *GADPH* 为内参，引物见表 1，用荧光定量 PCR 方法研究柑橘大实蝇 OBP 基因在不同组织中的表达水平。每样品重复 3 次。PCR 反应体系（10 μL）：2 × All-in-One qPCR Mix 5 μL，正反向引物（0.2 μmol/L）各 1 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 2 μL。PCR 扩增程序：95℃预变性 10 min；95℃变性 10 s，60℃退火 20 s，72℃延伸 10 s，共 40 个循环，最后以每 6 s 上升 0.5℃的速度从 65℃到 95℃记录熔解曲线，采用 QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪相应软件进行数据分析，EXCEL 整理数据。相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析（Livak and Schmittgen，2001）。将荧光定量所得数据用 SPSS 19.0 进行方差分析，采用 Duncan 氏多重比较检验法和 *T* 检验进行比较，分析柑橘大实蝇成虫不同组织中目的基因的表达量差异。

2 结果

2.1 柑橘大实蝇气味结合蛋白编码基因的克隆

反转录及 PCR 结果（图 1）显示，同源克隆获得柑橘大实蝇气味结合蛋白编码基因中间片段大小约为 200 bp 符合预期结果。5′ RACE 获得目的基因 5′末端片段约为 200 bp 符合预期，3′ RACE 获得 3′末端片段约为 310 bp 符合预期大小。特异性引物 BminOBP25-CDS-F/BminOBP25-CDS-R 扩增得到目的基因全长片段，大小约为 500 bp 符合预期。

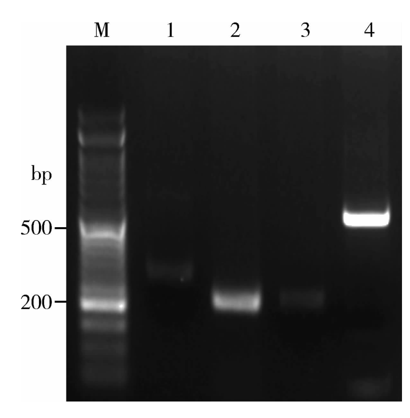


图 1 柑橘大实蝇 OBP 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of OBP gene of *Bactrocera minax*

M：DNA marker；1：3′末端片段 3′ end fragment；2：OBP 基因中间片段 Intermediate fragment；3：5′末端片段 5′ end fragment；4：全长片段 Full-length fragment.

2.2 柑橘大实蝇气味结合蛋白编码基因测序结果及序列生物信息学分析

同源克隆获得目的基因中间片段，测序结果表明该序列与典型昆虫气味结合蛋白序列具有高度相似性，初步判断所获得的片段是柑橘大实蝇 OBP 基因序列。根据该序列设计的 GSP 引物和试剂盒配套的接头引物扩增分别获得目的基因 5′端和 3′端序列，拼接获得柑橘大实蝇气味结合蛋白编码基因 cDNA 全长序列。根据 BminOBP25-CDS-F 和 BminOBP25-CDS-R 扩增后获得 447 bp 的特异性条带，测序结果与拼接结果一致，确定获得柑橘大实蝇 OBP25 cDNA 的完整序列。命名为 *BminOBP25*（GenBank 登录号：MH181875），编码 148 个氨基酸（图 2），分子量为 17.5 kD，N 端 22 个氨基酸为蛋白信号肽区，成熟肽含有 126 个氨基酸。TMHMM 跨膜区分析（图 3）表明 *BminOBP25* 的第 1－4 位氨基酸位于膜内，第 5－23 位氨基酸形成一个典型跨膜

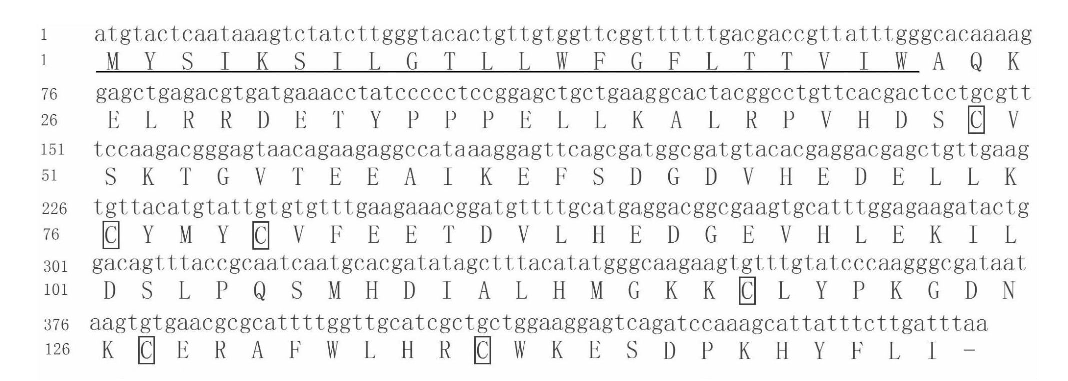


图 2　*BminOBP*25 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *BminOBP*25

下划线表示推导的信号肽；方框内表示 6 个保守的半胱氨酸。The predicted signal peptide sequence is underlined. Six conserved cysteins are boxed.

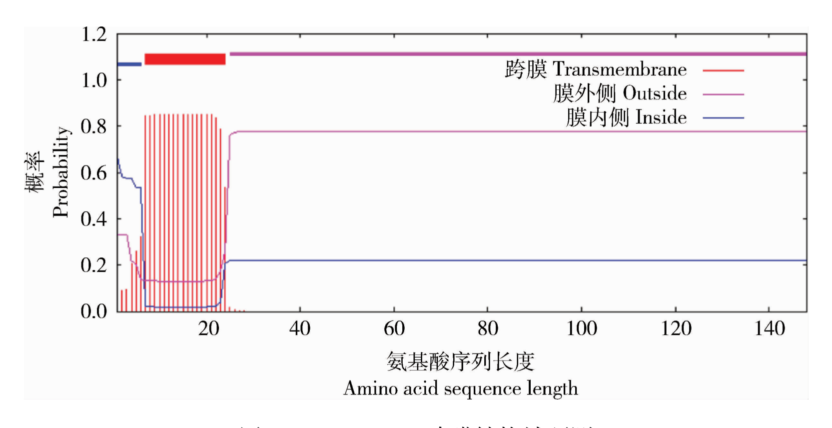


图 3　BminOBP25 跨膜结构域预测

Fig. 3　Predicted transmembrane domain of BminOBP25

区，第 24 – 148 位氨基酸位于膜外，表明 BminOBP25 可能为分泌型蛋白。用 ClustalW2 工具对柑橘大实蝇与其他双翅目昆虫 OBP 的氨基酸序列同源性进行比对（图 4），结果显示，BminOBP25 与其他双翅目昆虫的 OBP 蛋白类似，具有典型的 6 个保守的半胱氨酸残基和 6 个 α-螺旋结构域。用 MEGA 7.0 构建系统进化树（图 5），结果显示，柑橘大实蝇气味结合蛋白氨基酸序列与柑橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 气味结合蛋白 BdorOBP 序列一致性最高（88%），其次是与地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 气味结合蛋白 CcapOBP83a-2 和南美热带果蝇 *Drosophila willistoni* 气味结合蛋白 DwilOBP（分别为 86% 和 78%），而与其他昆虫的气味结合蛋白氨基酸序列仅具有 52% ~ 77% 的一致性，这反映了气味结合蛋白在几种昆虫间亲缘关系的远近。

2.3　原核表达及 Western blot 检测

*BminOBP*25 编码区获得后，用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切及 T4 DNA 连接酶构建重组原核表达载体 pET28a（+）-*BminOBP*25，转化到感受态细胞 BL21（DE3）后，IPTG 诱导表达。取适量诱导表达后的重组菌加入 SDS-PAGE Loading Buffer 处理，经 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 6 × His 标签单克隆抗体免疫印迹分析，结果出现特异性条带（图 6），在 20 kD 左右位置产生特异性蛋白条带，而未诱导菌液在相应位置没有产生特异性蛋白表达（泳道 1 和 5）（图 6：A）。表达产物 Western blot 印迹分析结果表明，所表达的融合蛋白确实为目的蛋白（图 6：B）。pET28a（+）-*BminOBP*25 在上清液（泳道 3 和 7）中有表达，但在包涵体（泳道 4 和 8）中没有表达（图 6：A）。

2.4　*BminOBP*25 的组织表达谱分析

根据 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量法，以雌成虫触角中的表达量为基准，测定 *BminOBP*25 在柑橘大实蝇成虫不同组织的表达谱。结果表明，*BminOBP*25 在雌成虫触角中的表达量最高（设为 1），在雌成虫足、头（去除触角）、产卵器、胸、腹和翅中的相对表达量分别是 0.89，0.79，0.68，0.32，0.34 和 0.18；在雄成虫中 *BminOBP*25 也是在触角中的表达量最高（0.92），在足、头（去除触角）、胸、腹和翅中的相对表达量分别是 0.87，0.71，0.39，0.29 和 0.21（图 7）。

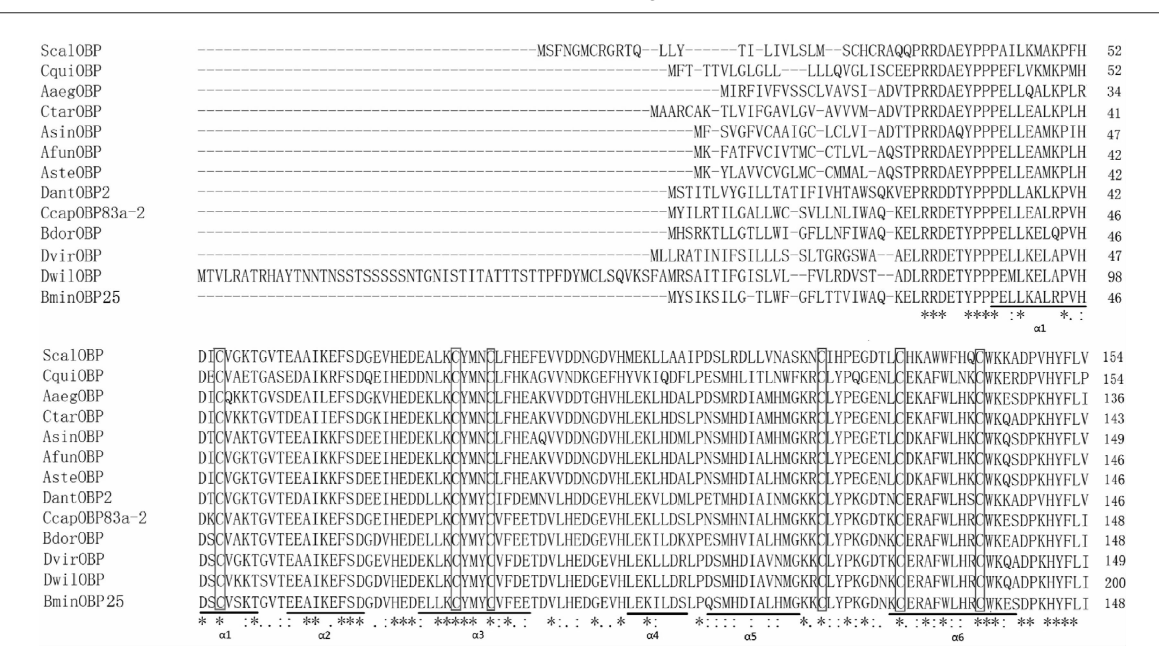


图 4 BminOBP25 与其他双翅目昆虫 OBP 的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of BminOBP25 with OBPs from other dipteran insects

OBPs 的来源及 GenBank 登录号 Source species of OBPs and their GenBank accession numbers：AaegOBP：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001663216.1）；AfunOBP：不吉按蚊 *Anopheles funestus*（ADQ01701.1）；AsinOBP：中华按蚊 *Anopheles sinensis*（AIR09579.1）；AsteOBP：斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*（ACS83757.1）；BdorOBP：桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（ACB56577.1）；BminOBP25：柑橘大实蝇 *Bactrocera minax*（MH181875）；CcapOBP83a-2：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（CDJ79887.1）；CquiOBP：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XP_001848939.1）；CtarOBP：环喙库蚊 *Culex tarsalis*（AAO73465.1）；DantOBP2：葱蝇 *Delia antigua*（BAI82442.1）；DvirOBP：黑果蝇 *Drosophila virilis*（XP_002058580.1）；DwilOBP：南美热带果蝇 *Drosophila willistoni*（XP_002073644.2）；ScalOBP：厩螯蚊 *Stomoxys calcitrans*（ACT75666.1）. α1－α6 分别表示6 个 α-螺旋；方框为 6 个保守半胱氨酸。α1－α6 represent six α-helices, respectively, and the six conserved cysteines are in boxes.

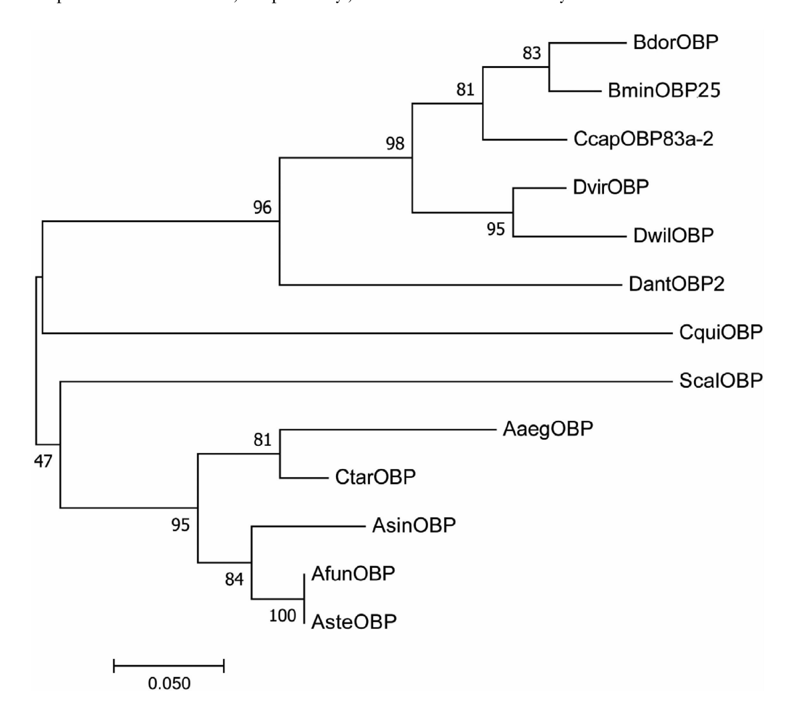


图 5 基于氨基酸序列构建的 BminOBP25 与其他昆虫 OBPs 的系统发育树（邻接法，1 000 次重复）

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of BminOBP25 and OBPs from other insect species (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

OBPs 来源及 GenBank 登录号 Source species of OBPs and the GenBank accession numbers：BdorOBP：桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（ACB56577.1）；BminOBP25：柑橘大实蝇 *Bactrocera minax*（MH181875）；CcapOBP83a-2：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（CDJ79887.1）；DvirOBP：黑果蝇 *Drosophila virilis*（XP_00258580.1）；DwilOBP：南美热带果蝇 *Drosophila willistoni*（XP_002073644.2）；DantOBP2：葱蝇 *Delia antigua*（BAI82442.1）；CquiOBP：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XP_001848939.1）；ScalOBP：厩螯蚊 *Stomoxys calcitrans*（ACT75666.1）；AaegOBP：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001663216.1）；CtarOBP：环喙库蚊 *Culex tarsalis*（AAO73465.1）；AsinOBP：中华按蚊 *Anopheles sinensis*（AIR09579.1）；AfunOBP：不吉按蚊 *Anopheles funestus*（ADQ01701.1）；AsteOBP：斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*（ACS83757.1）.

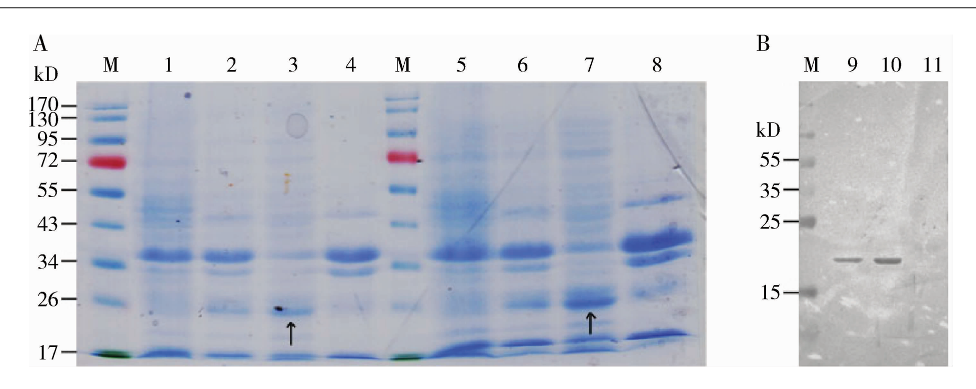


图 6　融合蛋白 BminOBP25 的可溶性分析(A)及 Western blotting(B)分析

Fig. 6　Solubility analysis (A) and Western blotting (B) of the BminOBP25 fusion protein

M：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker；1，5：未经 IPTG 诱导的 pET28a（+）-*BminOBP25* 表达产物 Expressed product of pET28a（+）-*BminOBP25* without IPTG induction；2，6：全菌中 IPTG 诱导的 pET28a（+）-*BminOBP25* 表达产物 Expressed product of pET28a（+）-*BminOBP25* after IPTG induction；3，7：上清中 pET28a（+）-*BminOBP25* 的 IPTG 诱导表达产物 Expressed product of pET28a（+）-*BminOBP25* in supernatant solution after IPTG induction；4，8：包涵体中 pET28a（+）-*BminOBP25* 的 IPTG 诱导表达产物(箭头示融合蛋白) Expressed product of pET28a（+）-*BminOBP25* in inclusion body after IPTG induction，the arrow indicating the fusion protein. 9，10：分别为 0.5 和 1.0 mol/L IPTG 诱导的带 6×His 标签的 pET28a（+）-*BminOBP25* 上清液 Supernatant solution of pET28a（+）-*BminOBP25* with 6×His tag after induction with 0.5 and 1.0 mol/L IPTG，respectively. 11：未经 IPTG 诱导的带 6×His 标签的 pET28a（+）-*BminOBP25* 上清液 Supernatant solution of pET28a（+）-*BminOBP25* with 6×His tag without IPTG induction.

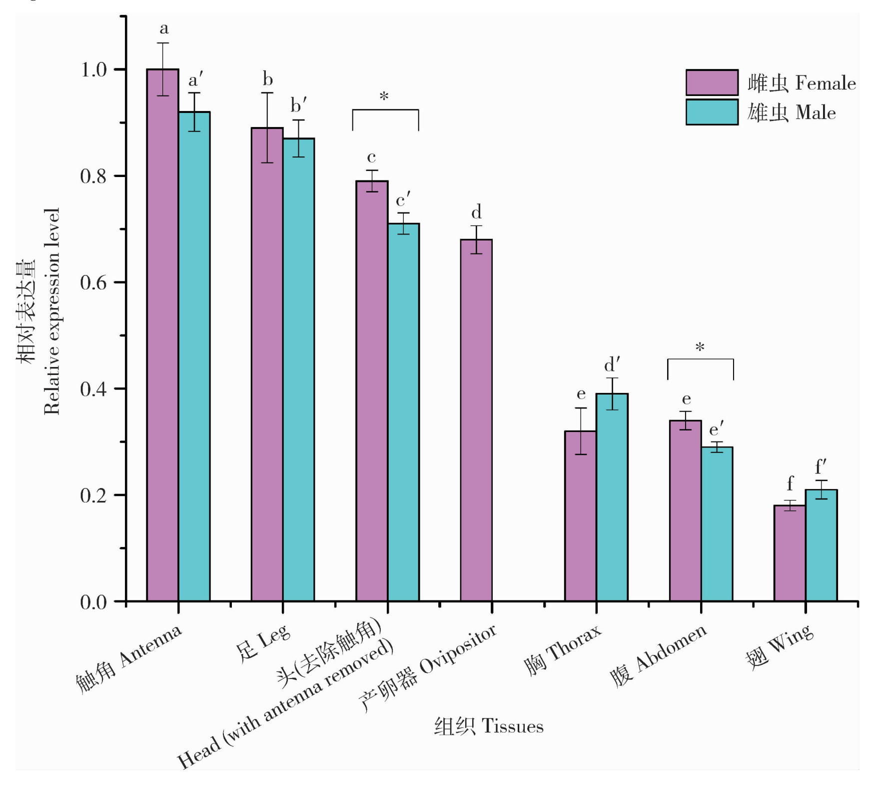


图 7　*BminOBP25* 在柑橘大实蝇成虫各组织中表达分析

Fig. 7　Expression profiles of *BminOBP25* in various tissues of *Bactrocera minax* adults

图中数据为平均值±标准误，不同组织中的基因表达量以雌虫触角中的表达量为基准。同性别柱上小写字母不同表示同性别的不同组织间差异显著($P<0.05$)(采用 Duncan 氏多重比较检验法)；星号表示同种组织不同性别间差异显著($P<0.05$)(采用 T 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. The relative expression levels of genes in different tissues are normalized to that in female antennae. Different lowercase letters above bars indicate significant differences among different tissues of the same sex ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test), and the asterisk indicates significant differences between the genders of the same tissue ($P<0.05$) (T-test).

3　讨论

昆虫 OBP 是一类低分子量的酸性可溶性蛋白，主要具有以下特征(1)分子量较小，约为 16 kD；(2)多肽链中有 6 个保守的半胱氨酸；(3)蛋白质呈酸性，等电点大都在 4.4~5.2；(4)蛋白大多存在于昆虫触角嗅觉感受器的淋巴液中（Breer *et al*., 1990；

Raming *et al*., 1990; McKenna *et al*., 1994; Pikielny *et al*., 1994; Dickens *et al*., 1996)。

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术,首次克隆了柑橘大实蝇 *BminOBP*25 基因的 cDNA 全长序列,开放阅读框全长 447 bp,编码 148 个氨基酸,预测分子量为 17.5 kD,由它推导的氨基酸序列的基本物理性状均符合昆虫气味结合蛋白家族的特征,特别是气味结合蛋白中的 6 个保守的半胱氨酸位点;并且 N-末端包含一个由 22 个氨基酸组成的信号肽,与已报道的其他昆虫气味结合蛋白特征(Vogt and Riddiford, 1981; Steinbrecht, 1996; Leal *et al*., 1999; Pelosi *et al*., 2006)基本一致。

经 MEGA 软件比对结果显示,柑橘大实蝇气味结合蛋白 BminOBP25 氨基酸序列与桔小实蝇的气味结合蛋白 BdorOBP 序列一致性最高,为 88%;其次是与地中海实蝇 CcapOBP83a-2,一致性为 86%;而与其他昆虫的气味结合蛋白仅具有 52% ~77% 的一致性,这反映了气味结合蛋白在几种昆虫间亲缘关系的远近。

Reyes 等(2005)研究表明,6 × His 标签在生理条件下不带电荷,基本不影响蛋白的结构及功能。因此,本研究将 *BminOBP*25 克隆到带有 T7 启动子的高效融合表达载体 pET 28a(+)中,构建成外源蛋白 N 端融合 6 × His 标签的重组表达质粒 pET 28a(+)-*BminOBP*25,并转入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,目的是后续可利用该标签检测、纯化 6 × His-BminOBP25 融合蛋白。在 20 kD 左右位置产生特异性蛋白条带,和推测的分子量大小一致,而未诱导菌液在相应位置没有产生特异性蛋白表达,并且蛋白在上清液中表达,在包涵体中不表达,表明成功表达出了 BminOBP25。通过 6 × His 标签单克隆抗体对在不同 IPTG 终浓度(0.5 和 1.0 mol/L)下诱导表达得到的融合蛋白样品作 Western blot 分析,结果表明两种 IPTG 浓度下目的蛋白都成功表达,且 1.0 mol/L 的 IPTG 浓度诱导下目的蛋白表达量更高。

气味结合蛋白是昆虫专一性识别外界气味物质的特异性蛋白(Zubkov *et al*., 2005)。触角和下颚须等嗅觉器官集中于头部,理论上气味结合蛋白应该主要在头部表达,许多研究表明 OBP 的表达并不局限于嗅觉组织(陈玲等, 2013; 吉挺等, 2014; 秦赠等, 2014; 钱凯等, 2015),它们可能参与其他的生理过程(Graham *et al*., 2003; Pophof, 2004; Pelosi *et al*., 2005)。而本研究结果发现,*BminOBP*25 在柑橘大实蝇成虫头(去除触角)、胸、腹、足、翅和产卵器中均有表达,且在触角、头(去除触角)、足和产卵器中有较高表达,提示该基因在非嗅觉组织中也具有生理功能,特别是可能还参与嗅觉识别和其他功能。毛形感器是昆虫体表分布最广、数量最多的感器,其功能多样,其中,嗅觉功能被证实在昆虫的取食与产卵地选择过程中起重要作用(Kim and Yamasaki, 1996),宋傲群等(2015)研究发现毛形感受器在柑橘大实蝇触角、足跗节、产卵器等部位均有分布,本研究的荧光定量 PCR 结果显示,*BminOBP*25 在柑橘大实蝇成虫触角、头(去除触角)、足、产卵器中表达量较高,提示 *BminOBP*25 在非嗅觉组织中可能也具有生理功能,特别是可能在昆虫的取食与产卵地选择过程中起重要作用。雌雄性间差异表达还需进一步研究。

*BminOBP*25 是首次报道的柑橘大实蝇的 OBP 基因。另外对于本实验已克隆的 *BminOBP*25 基因,我们将进一步表达纯化其蛋白,通过荧光竞争结合等实验,明确该气味结合蛋白的结合谱,为高效开发和设计柑橘大实蝇嗅觉引诱剂提供依据。

致谢 湖南师范大学生命科学学院 2012 级本科生宋傲群同学参与本研究的设计和实验工作,在此表示衷心感谢!

参考文献(References)

Breer H, Krieger J, Raming K, 1990. A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochem*., 20(7): 735-740.

Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Takahashi M, Pernollet JC, 2001. Ligand binding and physico-chemical properties of ASP2, a recombinant odorant-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L). *Eur. J. Biochem*., 268(3): 752-760.

Carey AF, Wang G, Su CY, Zwiebel LJ, Carlson JR, 2010. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*, 464 (7285): 66-71.

Chen L, Li HL, Zhou YX, Zhao L, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2013. cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin*., 56 (6): 612-621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. 昆虫学报, 56(6): 612-621]

Chen SX, Xie YZ, 1955. Taxonomic notes on the Chinese citrus fly, *Tetradacus citri* (Chen). *Acta Entomol. Sin*., 5(1): 123-126. [陈世骧, 谢蕴珍, 1955. 关于桔大实蝇的学名及其种征. 昆虫

学报, 5(1): 123 – 126]

Dong YC, Wan L, Pereira R, Desneux N, Niu CY, 2014. Feeding and mating behaviour of Chinese citrus fly *Bactrocera minax* (Diptera, Tephritidae) in the field. *J. Pest Sci.*, 87(4): 647 – 657.

Dorji C, Clarke AR, Drew RAI, 2006. Seasonal phenology of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in western Bhutan. *Bull. Entomol. Res.*, 96(5): 531 – 538.

Drew RAI, Dorji C, Romig MC, Loday P, 2005. Attractiveness of various combinations of colors and shapes to females and males of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in a commercial mandarin grove in Bhutan. *J. Econ. Entomol.*, 99(5): 1651 – 1656.

Graham LA, Brewer D, Lajoie G, Davies PL, 2003. Characterization of a subfamily of beetle odorant-binding proteins found in hemolymph. *Mol. Cell Proteomics*, 2(8): 541 – 549.

Ji T, Shen F, Liang Q, Wu LM, Liu ZG, Luo YX, 2014. Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an OBP3 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(8): 897 – 904. [吉挺, 沈芳, 梁勤, 吴黎明, 刘振国, 罗岳雄, 2014. 中华蜜蜂 OBP3 基因的克隆、原核表达及组织表达谱. 昆虫学报, 57(8): 897 – 904]

Kim JL, Yamasaki T, 1996. Sensilla of *Carabus* (*Isiocarabus*) *fiduciarius saishutoicus* Csiki (Coleoptera: Carabidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 25 (s1 – 2): 153 – 172.

Leal WS, Nikonova L, Peng G, 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth *Bombyx mori*. *FEBS Lett.*, 464(1 – 2): 85 – 90.

Liu L, Zhou Q, 2016. Olfactory response of female *Bactrocera minax* to chemical components of the preference host citrus volatile oils. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 19: 637 – 642.

Liu L, Zhou Q, Song AQ, You KX, 2014. Adult oviposition and larval feeding preference for different citrus varieties in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(9): 1037 – 1044. [刘路, 周琼, 宋傲群, 尤克西, 2014. 柑橘大实蝇对不同柑橘品种的产卵偏好和幼虫取食选择. 昆虫学报, 57(9): 1037 – 1044]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(– Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16340 – 16347.

Pelosi P, Calvello M, Ban L, 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chem. Senses*, 30(1): 291 – 292.

Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 111(3): 503 – 514.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban L, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658 – 1676.

Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, 1994. Members of a family of drosophila putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1): 35 – 49.

Pophof B, 2004. Pheromone-binding proteins contribute to the activation of olfactory receptor neurons in the silkmoths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *Chem. Senses*, 29(2): 117 – 125.

Qian K, Feng B, Wu XL, Lao C, Shen YL, Du YJ, 2015. Cloning, sequence analysis, tissue expression profiling and prokaryotic expression of odorant binding protein genes *MaltOBP*2 and *MaltOBP*6 from *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 496 – 506. [钱凯, 冯波, 巫诩亮, 劳冲, 沈幼莲, 杜永均, 2015. 松墨天牛 OBP 基因 *MaltOBP*2 和 *MaltOBP*6 的克隆、序列分析及组织表达谱和原核表达研究. 昆虫学报, 58(5): 496 – 506]

Qin Z, Ran YH, Zhi ZJ, Yan ZT, Zhang YJ, Huang T, He ZB, Chen B, 2014. Cloning and expression analysis of an odorant binding protein gene *AsinOBP*1 from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(11): 1289 – 1298. [秦赠, 冉永红, 支中婧, 闫振天, 张玉娟, 黄婷, 何正波, 陈斌, 2014. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP*1 的克隆和表达分析. 昆虫学报, 57(11): 1289 – 1298]

Reyes LF, Sommer CA, Beltramini LM, Henrique-Silva FH, 2005. Expression, purification, and structural analysis of his UBE2G (human conjugating enzyme). *Protein Expr. Purif.*, 45(3): 324 – 328.

Song AQ, Zhou Q, Liu L, Huang KR, 2015. Sensilla of adult *Bactrocera minax* observed with scanning electron microscope. *J. Environ. Entomol.*, 37(6): 1295 – 1299. [宋傲群, 周琼, 刘路, 黄科瑞, 2015. 柑橘大实蝇成虫超微感器的扫描电镜观察. 环境昆虫学报, 37(6): 1295 – 1299]

Steinbrecht RA, 1996. Structure and function of insect olfactory sensilla. *Ciba Found. Symp.*, 200: 158 – 174.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, and OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24(5): 481 – 459.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5823): 161 – 163.

Wang J, Zhou HY, Zhao ZM, 2014. Effects of juvenile hormone analogue and ecdysteroid on adult eclosion of the fruit fly *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 107(4): 1519 – 1525.

Wang XJ, Luo LY, 1995. Advances in research on *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Entomol. Knowl.*, 32(5): 310 – 315. [汪兴鉴, 罗禄怡, 1995. 桔大实蝇的研究进展. 昆虫知识, 32(5): 310 – 315]

Zubkov S, Gronenborn AM, Byeon IH, Mohanty S, 2005. Structural consequences of the pH-induced conformational switch in *A. polyphemus* pheromone-binding protein: mechanism of ligand release. *J. Mol. Biol.*, 354(5): 1081 – 1090.

(责任编辑: 马丽萍)